

130

---

血小板産生の調節に関する基礎的ならびに臨床的研究

---

<研究課題番号> 07457235

平成7年度～平成8年度科学研究費助成金（一般研究B）

研究成果報告書



平成9年3月

研究代表者 溝口秀昭

(東京女子医科大学医学部教授)

課題番号 07457235

研究課題 血小板産生の調節に関する基礎的ならびに臨床的研究

研究組織 研究代表者 溝口 秀昭 (東京女子医科大学医学部教授)  
研究分担者 寺村 正尚 (東京女子医科大学医学部講師)  
和田真紀夫 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費 平成7年度 5,000 千円  
平成8年度 2,100 千円  
計 7,100 千円

## 研究発表

### I 学会誌等

1. Yamada O, Oshimi K, Motoji T, Mizoguchi H: Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. *J. Clin. Invest.* 95:1117-1123, 1995
2. Shimizu H, Matsushita Y, Aoki K, Nomura T, Yoshida Y, Mizoguchi H: Prevalence of the myelodysplastic syndromes in Japan. *Int J Hematol* 61:17-22, 1995
3. Urabe A, Mizoguchi H, Takaku F: Efficacy of high-dose erythropoietin in myelodysplastic syndromes: phase II/III clinical trials. *Myelodysplastic Syndromes Advances in Research and Treatment.* 1995 p343-355
4. Motoji T, Okada M, Takanashi M, Oshimi K, Mizoguchi H: Abolition of suppressive effect of acute myeloid leukemia cells on normal granulocyte-macrophage colony formation induced by interleukin-5 associated with eosinophilic cell induction. *Leukemia and Lymphoma* 18:171-178, 1995
5. Wada M, Seeger RC, Mizoguchi H, Koeffler HP: Maintenance of normal imprinting of H19 and IGF2 genes in neuroblastoma. *Cancer Research* 55:3386-3388, 1995
6. Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, Hirokawa S, Miura Y, Takeyama K, Kamada N, Ohtake S, Uike N, Shimazaki C, Toyama K, Hirano M, Mizoguchi H, Kobayashi Y,

- Fyrusawa S, Saito M, Emi N, Yazaki Y, Ueda R, Hirai H: Loss of the cyclin  
-dependent kinase 4-inhibitor (p16;MTS1) gene is frequent in and highly specific to  
lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood* 86:1548-1556,  
1995
7. Kaneko T, Fukuda J, Yoshihara T, Zheng H, Mori S, Mizoguchi H, Oshimi K: Nasel  
nature killer (NK) cell lymphoma: report of case with activated NK cells containing  
Epstein-Barr virus and expressing CD21 antigen, and comparative studies of their  
phenotype and cytotoxicity with normal NK cells. *Br J Haematol* 91:355-361, 1995
8. Onishi K, Ohno R, Tomonaga M, Kamada N, Onozawa K, Kuramoto A, Dohy H,  
Mizoguchi H, Miyawaki S, Tsubaki K, Miura Y, Omine M, Kobayashi T, Naoe T,  
Oshima T, Hirashima K, Ohtake S, Takahashi I, Morishima Y, Naito K, Asou N,  
Tanimoto M, Sakuma A, Yamada K, the Kouseisho Leukemia Study Group: A  
randomized trial compaing interferon- $\alpha$  with busulfan for newly diagnosed chronic  
myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* 86:906-916, 1995
9. 溝口秀昭：再生不良性貧血の治療の進歩。臨床血液 36:511-516, 1995
10. 溝口秀昭：Stem Cell Factor. 頭頸部腫瘍 21:562-565, 1995
11. 風間啓至、青山雅、鮫島勇一、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀  
昭、岡田美智子：ins(21;8)の染色体異常を呈し、AML1-MTG8 (ETO) キメラ  
mRNA が検出された AML (M2) の1例。臨床血液 36:806, 1995

- 12.磯部泰司、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭：生体腎移植後に Burkitt 腫を発症した 1 例。臨床血液 37:169, 1996
- 13.溝口秀昭：トロンボポエチン。臨床血液 37:483-487, 1996
- 14.溝口秀昭：トロンボポエチンの基礎と臨床。日本内科学会雑誌 85:232-236, 1996
15. Azuma EK, Yuo A, Matsushima K, Kasahara T, Mizoguchi H, Saito M, Takaku F, Kitagawam S: Activation and priming of human monocytes by monocyte chemotactic and activating factor: cooperation with other inflammatory cytokines and close association between an increase in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> and intracellular acidification. Exp Hematol 24:169-175, 1996
16. Nakao S, Takami A, Sugimori N, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, Mizoguchi H: Response to immunosuppressive therapy and an HLA-DRB1 allele in patients with aplastic anemia: HLA-DRB1\*1501 does not predict response to antithymocyte globulin. Br J Haematol 92:155-158, 1996
17. Teramura M, Kobayashi S, Yoshinaga K, Iwabe K, Mizoguchi H: Effect of interleukin-11 on normal and pathological thrombopoiesis. Cancer Chemoth Pharm 38: s99-102, 1996

18. Motoji T, Takanashi M, Motomura S, Wang YH, Shiozaki H, Aoyama M, Mizoguchi H: Growth stimulatory effect of thrombopoietin on the blast cells of acute myelogenous leukemia. *Br J Hematol* 94:513-516, 1996
19. Teramura M, Kobayashi S, Iwabe K, Yoshinaga K, Mizoguchi H: Mechanism of action of antithymocyte globulin in the treatment of aplastic anemia: in vitro evidence for the presence of immunosuppressive mechanism. *Br J Haematol* 96:80-84, 1997
20. Yamada O, Motoji T, Mizoguchi H: Up-regulation of telomerase activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1314:260-266, 1996
21. Ido M, Nagata C, Kawakami N, Shimizu H, Yoshida Y, Nomura T, Mizoguchi H: A case-control study of myelodysplastic syndromes among Japanese men and women. *Leukemia Res* 20:727-731, 1996
22. Wang YH, Motoji T, Motomura S, Shiozaki H, Tsuruo T, Mizoguchi H: Recovery of drugs sensitivity by MS-209, a new multidrug resistance-reversing agent, on acute myelogenous leukaemic blasts and K562 cells resistant to adriamycin cell line. *Br J Haematol*. In press. 1997
23. Wada M, Miller CW, Yokota J, Lee E, Mizoguchi H, Koeffler HP: Molecular analysis of the adenomatous polyposis coligene in sarcomas, hematological malignancies and noncolonic, neoplastic tissues. *J Mol Med*. In press. 1997

24. Arai Y, Masuda M, Sugawara I, Arai T, Motoji T, Tsuruo T, Oshimi K, Mizoguchi H: Expression of the MDR1 and MDR3 gene products in acute and chronic leukemias. *Leukemia Res.* In press. 1997
25. Masuda M, Arai Y, Okamura T, Mizoguchi H: Pure red cell aplasia with thymoma: evidence of T-cell clonal disorder. *Am J Hematol.* In press. 1997
26. 新井ゆかり、岡村隆光、和田眞紀夫、寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭：13年の経過後、急性リンパ性白血病を発症した真性赤血球増加症。臨床血液 37:1405-1409, 1996

## II 口頭発表

1. 名倉英一、河村節子、村上博和、溝口秀昭、坂巻壽、野村武夫、木村禧代二  
：多施設共同研究における成人急性白血病長期生存例の予後と QOL の検討。  
第 57 回日本血液学会総会、1995
2. 中尾真二、高松秀行、中条達也、高見昭良、杉森尚美、伊藤高明、上田幹夫、  
松田保、塩原信太郎、溝口秀昭：再生不良性貧血患者の HLA-DRB1 対立遺  
伝子と免疫抑制療法に対する反応性－ AT(L)G とシクロスポリンの比較－。  
第 57 回日本血液学会総会、1995
3. 岡村隆光、増田道彦、新井ゆかり、溝口秀昭：白血病細胞株 HL60 に対する  
Am80 の分化誘導作用の検討。第 57 回日本血液学会総会、1995
4. 寺村正尚、吉永健太郎、岩部弘治、溝口秀昭：c-Mpl リガンドのヒト巨核球  
産生に対する作用。第 57 回日本血液学会総会、1995
5. 岩部弘治、吉永健太郎、寺村正尚、溝口秀昭：巨核芽球性白血病細胞株に対  
する c-Mpl リガンドと K252a 相互作用について。第 57 回日本血液学会総会、  
1995
6. 吉永健太郎、岩部弘治、寺村正尚、溝口秀昭、八木澤雅子、湯尾明、高久史  
麿：c-Mpl リガンドの巨核球系細胞への作用とそのチロシンリン酸化による  
シグナル伝達についての検討。第 57 回日本血液学会総会、1995



- 7.山田修、溝口秀昭、星野茂：急性白血病の臨床経過に伴うテロメア DNA の変化。第 57 回日本血液学会総会、1995
  
- 8.増田道彦、大澤まゆみ、新井ゆかり、岡村隆光、溝口秀昭、島影美鈴：Ki-1 リンパ腫細胞に対する抗 CD 抗体およびサイトカインの作用。第 57 回日本血液学会総会、1995
  
- 9.王艶華、泉二登志子、本村小百合、溝口秀昭：薬剤耐性白血病株 K562/ADM および急性白血病細胞における MS-209 の抗腫瘍剤感受性回復効果の検討。第 57 回日本血液学会総会、1995
  
- 10.畦西恭彦、弘田稔幸、西村純一、植田悦子、木谷照夫、井上徳光、竹田潤二、木下タロウ、溝口秀昭：本邦再生不良性貧血例に出現した GPI アンカー型蛋白欠損血球における PIG-A 遺伝子の解析。第 57 回日本血液学会総会、1995
  
- 11.泉二登志子、王艶華、本村小百合、溝口秀昭、荒井勉、菅原勇：急性白血病細胞における薬剤耐性関連蛋白(MRP)遺伝子の発現。第 57 回日本血液学会総会、1995
  
- 12.外山圭助、大屋敷一馬、吉田弥太郎、野村武夫、溝口秀昭：骨髓異形成症候群の予後判定におけるスコアリングシステムの比較検討。第 57 回日本血液学会総会、1995

13. 小熊茂、吉田弥太郎、内野治人、前川正、野村武夫、溝口秀昭：骨髓異形成症候群の病型移行－全国調査の解析－。第 57 回日本血液学会総会、1995
14. 溝口秀昭：トロンボポエチンの基礎と臨床。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
15. 山田修、泉二登志子、溝口秀昭、押味和夫：赤芽球癆を伴う T 細胞型顆粒リンパ球増多症にはシクロスファミドが有効である。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
16. 王艶華、泉二登志子、本村小百合、溝口秀昭：薬剤耐性白血病細胞に対する耐性克服剤 MS-209、SDZ PSC 833 および cyclosporin A(CyA)の抗腫瘍剤感受性回復効果の比較。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
17. 本村小百合、泉二登志子、王艶華、溝口秀昭、高梨美乃子、塩崎宏子：多剤耐性遺伝子 *mdr-1* アンチセンスオリゴヌクレオチドによるアドリアマイシン耐性白血病細胞株 K562/ADM に対する P 糖蛋白抑制効果の検討。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
18. 岩部弘治、吉永健太郎、寺村正尚、溝口秀昭：巨核球多倍体化モデルにおける細胞周期関連タンパクの変動。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
19. 新井ゆかり、増田道彦、岡村隆光、溝口秀昭：T-ALL の免疫学的表現型と TAL-1 遺伝子の発現。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995

- 20.和田眞紀夫、溝口秀昭：造血悪性腫瘍における APC 遺伝子の体細胞性変異の検索。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
- 21.泉二登志子、王艶華、本村小百合、溝口秀昭、高梨美乃子、塩崎宏子：c-Mpl ligand の急性骨髄性白血病細胞に対する増殖刺激作用の検討。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
- 22.岡村隆光、増田道彦、新井ゆかり、溝口秀昭：ヒト骨髄腫細胞における all-trans retinoic acid と Am80 抗腫瘍効果の検討。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
- 23.厚生省特発性造血障害調査研究班 河北誠、須田年生、溝口秀昭：造血障害血清中の可溶性 c-kit 分子。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
- 24.増田道彦、新井ゆかり、鮫島勇一、森直樹、和田眞紀夫、青山雅、山田修、寺村正尚、泉二登志子、溝口秀昭：慢性骨髄性白血病に対するインターフェロン療法。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
- 25.宮腰重三郎、武藤良知、鈴木憲史、斉藤恒博、泉二登志子、溝口秀昭、森真由美、浦部晶夫、戸川敦：白血病細胞表面形質と G-CSF に対する反応性（第 2 報）。第 37 回日本臨床血液学会総会、1995
- 26.北川誠一、吾妻英里子、古川雄祐、斉藤政樹、湯尾明、高久史麿、溝口秀昭：単球特異的走化性サイトカイン MCAF/MCP-1 の作用とその機序。第 37

回日本臨床血液学会総会、1995

27. 泉二登志子、高梨美乃子、王艶華、本村小百合、溝口秀昭：c-Mpl ligand の急性骨髄性白血病細胞に対する増殖刺激作用の検討。第 54 回日本癌学会総会、1995
28. 岩部弘治、吉永健太郎、青山雅、寺村正尚、溝口秀昭：K-252a および c-Mpl リガンドのヒト巨核芽球性白血病細胞株、Meg-J に対する分化誘導作用。第 54 回日本癌学会総会、1995
29. 溝口秀昭：Stem Cell Factor. 第 19 回日本頭頸部腫瘍学会総会、1995
30. Yamada O, Mizoguchi H: Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. Japanese Society of Gene Therapy, The First Annual Meeting, 1995
31. Kawakita M, Suda T, Mizoguchi H: Serum soluble c-kit levels in patients with hematopoietic disorders. International Society for Experimental Hematology, 24th Annual Meeting, 1995
32. Mizoguchi H, Teramura M: Effect of thrombopoietin (c-MLP ligand) on human megakaryocytopoiesis. International Society for Experimental Hematology, 24th Annual Meeting, 1995
33. Yoshida Y, Uchino H, Maekawa T, Nomura T, Mizoguchi H: Long-term

- administration of G-CSF in the myelodysplastic syndromes (MDS). International Society for Experimental Hematology, 24th Annual Meeting, 1995
34. Motoji T, Motomura S, Wang Y, Takanashi M, Mizoguchi H: Effect of c-MPL ligand on the proliferation of blast cells from acute myelogenous leukemia. International Society for Experimental Hematology, 24th Annual Meeting, 1995
35. Wang Y, Motoji T, Motomura S, Mizoguchi H: recovery of drug sensitivity by MS-209 on drug resistant acute myelogenous leukemic cells. International Society for Experimental Hematology, 24th Annual Meeting, 1995
36. 泉二登志子、王艶華、本村小百合、溝口秀昭、塩崎宏子、柵木信男、星野茂、高橋正知、佐野文明、菅原勇：急性白血病細胞における glutathione S-transferase- $\pi$  とその薬剤耐性への関連性。第 58 回日本血液学会総会、1996
37. 山田修、泉二登志子、溝口秀昭、高橋正知、柏村真：各種慢性骨髄増殖性疾患のテロメラーゼ活性。第 58 回日本血液学会総会、1996
38. 小林祥子、寺村正尚、岩部弘治、吉永健太郎、溝口秀昭：ヒト巨核球系細胞における転写因子の検討。第 58 回日本血液学会総会、1996
39. 小峰光博、藤原光、原田浩史、森啓、三輪史朗、内野治人、刈米重夫、前川正、野村武夫、溝口秀昭：自己免疫性溶血性貧血の診断基準の評価。第 58 回日本血液学会総会、1996

- 40.岡村隆光、増田道彦、新井ゆかり、鮫島勇一、溝口秀昭、首籐紘一：骨髄腫細胞における all-trans retinoic acid(ATRA)の作用。第 58 回日本血液学会総会、1996
- 41.王艶華、山田修、鮫島勇一、泉二登志子、溝口秀昭：赤芽球癆を合併した免疫芽球性リンパ節症の患者血清の赤血球系前駆細胞増殖に及ぼす影響。第 58 回日本血液学会総会、1996
- 42.増田道彦、新井ゆかり、岡村隆光、鮫島勇一、溝口秀昭、島影美鈴：Ki-1 リンパ腫細胞に対するアポトーシスの誘導。第 58 回日本血液学会総会、1996
- 43.新井ゆかり、増田道彦、岡村隆光、島影美鈴、溝口秀昭：Ki-1 リンパ腫細胞におけるインターロイキン 8 の産生。第 58 回日本血液学会総会、1996
- 44.原田浩史、小峰光博、野村武夫、前川正、溝口秀昭：赤血球破碎症候群の臨床病態－全国調査の集計成績。第 58 回日本血液学会総会、1996
- 45.伊藤慶子、国分政樹、卜部匡司、間野博行、小澤敬也、溝口秀昭：遺伝子導入造血幹細胞の選択的増幅法の開発：G-CSF レセプター／エストロゲンレセプター融合遺伝子の利用。第 58 回日本血液学会総会、1996
- 46.吉永健太郎、寺村正尚、岩部弘治、小林祥子、溝口秀昭、塩津行正：Indolocarbazole 系化合物 KT-6352 のヒト巨核球系細胞に対する作用。第 58 回日本血液学会、1996

- 47.塩津行正、村形力、玉沖達也、山下錦也、秋永士郎、寺村正尚、溝口秀昭、石田陽治、厨信一郎：Indolocarbazole 系化合物 KT-6352 のマウス血小板造血に対する作用。第 58 回日本血液学会、1996
- 48.山田修、泉二登志子、溝口秀昭：ヒト末梢血単核球のテロメラーゼ活性の誘導。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 49.岩部弘治、寺村正尚、吉永健太郎、新井ゆかり、小林祥子、鮫島勇一、和田眞紀夫、山田修、増田道彦、泉二登志子、溝口秀昭：当科における再生不良性貧血に対する ATG の治療成績。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 50.泉二登志子、王艶華、本村小百合、溝口秀昭、荒井勉、菅原勇、塩崎宏子、高橋正知、佐野文明、星野茂、柵木信男：急性白血病における p 糖蛋白(p-gp)、MRP(multidrug resistance-associated protein)の発現と細胞内薬剤含有量、治療効果との関連。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 51.本村小百合、泉二登志子、王艶華、溝口秀昭、高梨美乃子、塩崎宏子：多剤耐性遺伝子 mdr-1 アンチセンスによる薬剤耐性白血病細胞の p 糖蛋白抑制効果の検討。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 52.村松理子、増田道彦、吉永健太郎、新井ゆかり、小林祥子、鮫島勇一、和田眞紀夫、山田修、寺村正尚、泉二登志子、溝口秀昭、岡田美智子：骨髄異形成症候群における染色体異常。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996

- 53.増田道彦、岡村隆光、吉永健太郎、新井ゆかり、小林祥子、鮫島勇一、和田眞紀夫、山田修、寺村正尚、泉二登志子、溝口秀昭、斉藤博：急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫に対する L-17M 療法。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 54.岡村隆光、増田道彦、新井ゆかり、大津千晴、溝口秀昭：CD30 陽性 T 細胞系急性リンパ球生白血病細胞株(NOR)樹立とその性状。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 55.伊藤慶子、溝口秀昭、上田泰次、卜部匡司、間野博行、小澤敬也、坂田恒昭、長谷川護：マウス骨髄細胞への新規選択的増幅遺伝子の導入とその活性化による *in vitro* コロニー形成。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 56.特発性造血障害調査研究班溶血性貧血分科会 小峰光博、内野治人、前川正、三輪史朗、野村武夫、溝口秀昭：自己免疫性溶血性貧血症例集団の長期追跡調査。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 57.小山田隆、亀崎豊実、近江俊徳、梶井英治、小峰光博、溝口秀昭：Cooms 陰性溶血性貧血における赤血球結合 IgG の測定とその意義。第 38 回日本臨床血液学会総会、1996
- 58.溝口秀昭：貧血の診断と治療の進歩。第 15 回日本内科学会信越支部生涯教育講演会、1996



59. 泉二登志子、荒井勉、王艶華、本村小百合、菅原勇、溝口秀昭：急性白血病細胞における薬剤耐性関連遺伝子発現、産生蛋白の有無および薬剤感受性と治療効果との関連。第 55 回日本癌学会総会、1996
60. 伊藤慶子、卜部匡司、間野博行、溝口秀昭、上田泰次、坂田恒昭、長谷川護、小澤敬也：新規選択的増幅遺伝子による遺伝子導入造血幹細胞の体内選択的増幅法の開発。第 55 回日本癌学会総会、1996
61. Ito K, Urabe M, Mano H, Mizoguchi H, Ozawa K: A novel strategy for selective expansion of genetransduced hematopoietic stem cells: application of G-CSF receptor/estrogen receptor chimeric cDNA as a selective amplifier gene. 第 2 回日本遺伝子治療学会、1996
62. Ito K, Urabe M, Mano H, Mizoguchi H, Ozawa K: Development of a novel selective amplifier gene for in vivo selective expansion of transduced hematopoietic stem cells. International Society of Hematology, 26th Congress , 1996
63. Motomura S, Motoji T, Wang Y, Yamato I, Takanashi M, Shiozaki H, Mizoguchi H: Use of antisense oligonucleotides to human multidrug resistance gene (mdr1) to inhibit p-glycoprotein of human acute myelogenous leukemic blasts in vitro. International Society for Experimental Hematology, 25th Annual Meeting, 1996
64. Ozawa K, Ito K, Urabe M, Mizoguchi H, Sakata T, Hasegawa M: Development of a novel selective amplifier gene for in vivo selective expansion of transduced

hematopoietic stem cells . International Society for Experimental Hematology, 25th Annual Meeting, 1996

65. Mizoguchi H, Iwabe K, Yoshinaga K, Kobayashi S, Teramura M: K-252a induces polyploidization and differentiation of human megakaryoblastic cell lines; synergistic effects of K-252a and cytokines including thrombopoietin(TPO). International Society for Experimental Hematology, 25th Annual Meeting, 1996
  
66. Motoji T, Arai Y, Wang Y, Motomura S, Yamato I, Takanashi M, Shiozaki H, Sugawara I, Mizoguchi H: Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) and multidrug resistance gene (mdr1) on blast cells with acute leukemia and it's relationship with sensitivity and clinical outcome. International Society for Experimental Hematology, 25th Annual Meeting, 1996

## 研究成果

以下のとおり

### 研究目的

1994年、血小板の産生刺激因子であるトロンボポエチン（TPO、c-Mplリガンド）がクローニングされた。TPO欠損マウスにおいては血小板数が正常の15%に減少することか、TPOは血小板減少時の血小板産生のみでなく、恒常的な血小板産生においても不可欠な因子であることが明らかにされた。TPOの発見により30年来の血小板産生の主要な刺激因子については、ほぼ解明されたと考えられる。しかし、巨核球を増殖、成熟させるシグナル伝達機構、巨核球多倍体化の機序、血小板の放出機構などについては不明であり、今後の研究課題であると考えられる。本研究は、これらの巨核球-血小板産生機構のうち、TPOによるシグナル伝達機構、巨核球の多倍体化の機序、巨核球産生に関わる転写因子を解明することを目的とした。特に巨核球の多倍体化機構については細胞周期関連蛋白、とくにG<sub>2</sub>/M期に関連したcdc2キナーゼ、cyclinB1などの蛋白が変化し、M期を経ないでG<sub>2</sub>/S期へ移行するという現象がおきたという仮説のもとに、cyclinB1に注目して研究を行うことを目的とした。また、血小板異常を伴う種々の血液疾患に対するTPOの関与およびその治療薬としての可能性についても検討することを目的とした。

## (1) ヒト巨核球におけるシグナル伝達機構の検討

### 【方法】

#### (1) チロシンリン酸化蛋白の検討

当科で樹立したヒト巨核球系白血病細胞株、Meg-Jを用いて検討した。Meg-J細胞はTPOにより、増殖が刺激されるとともに血小板糖蛋白IIb/IIIa(CD41a)、Ib(CD42b)の発現が増強されるので、TPOのシグナル伝達を解析する上で有用な細胞株である。。まずMeg-J細胞をFCS(ウシ胎児血清)の影響を除くために、TPO刺激の15~24時間前より5%BSA(ウシ血清アルブミン)を含むRPMI1640培地にて培養し、これをHBSS(Hank's balanced salt solution)に再浮遊させTPOで刺激した。液体窒素で反応を停止させた後、TritonX-100を含むLysis bufferを用いて蛋白を抽出した。つぎに抽出した蛋白をSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動したのちニトロセルロース膜に蛋白を転写した。これを抗チロシンリン酸化抗体(anti-PY)を用いてイムノプロットした。

#### (2) 免疫沈降によるリン酸化蛋白の同定

上記の方法で得た蛋白抽出液より特異抗体をつけたセファロースビーズを用いて特異蛋白を抽出し、TPOによる蛋白リン酸化の有無をイムノプロットにて検討した。

### 【結果】

Total cell lysatesを用いてTPO刺激後の蛋白リン酸化の時間経過をみた実験では、TPO刺激5分後より42kDaおよび95kDaの蛋白のリン酸化が認められた(図1)。微量に存在するリン酸化蛋白を検出する目的で、あらかじめ抗チロシンリン酸化抗体で免疫沈降し抽出した蛋白を泳動したところ、さらに130kDaの蛋白

図 1. TPO刺激によるチロシンリン酸化

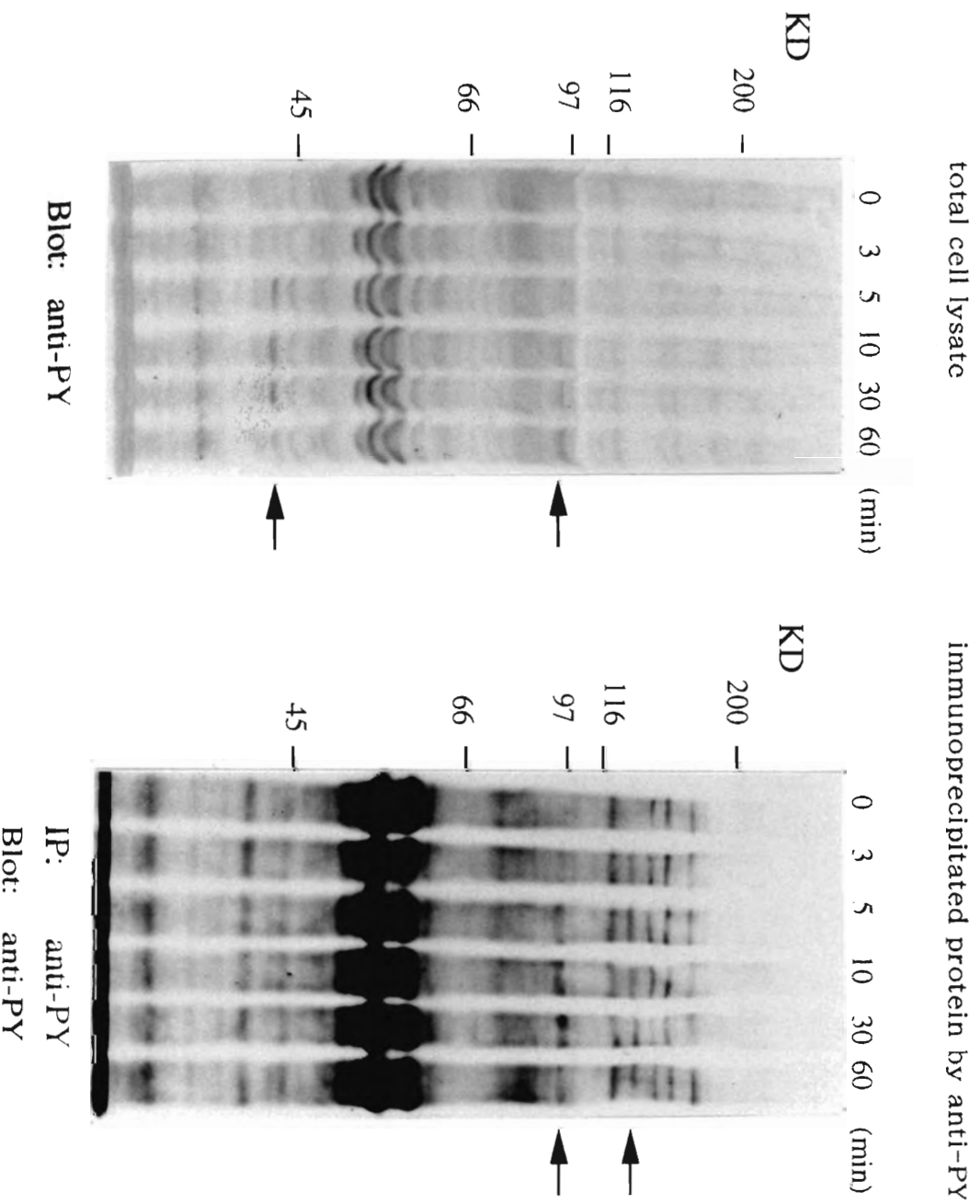
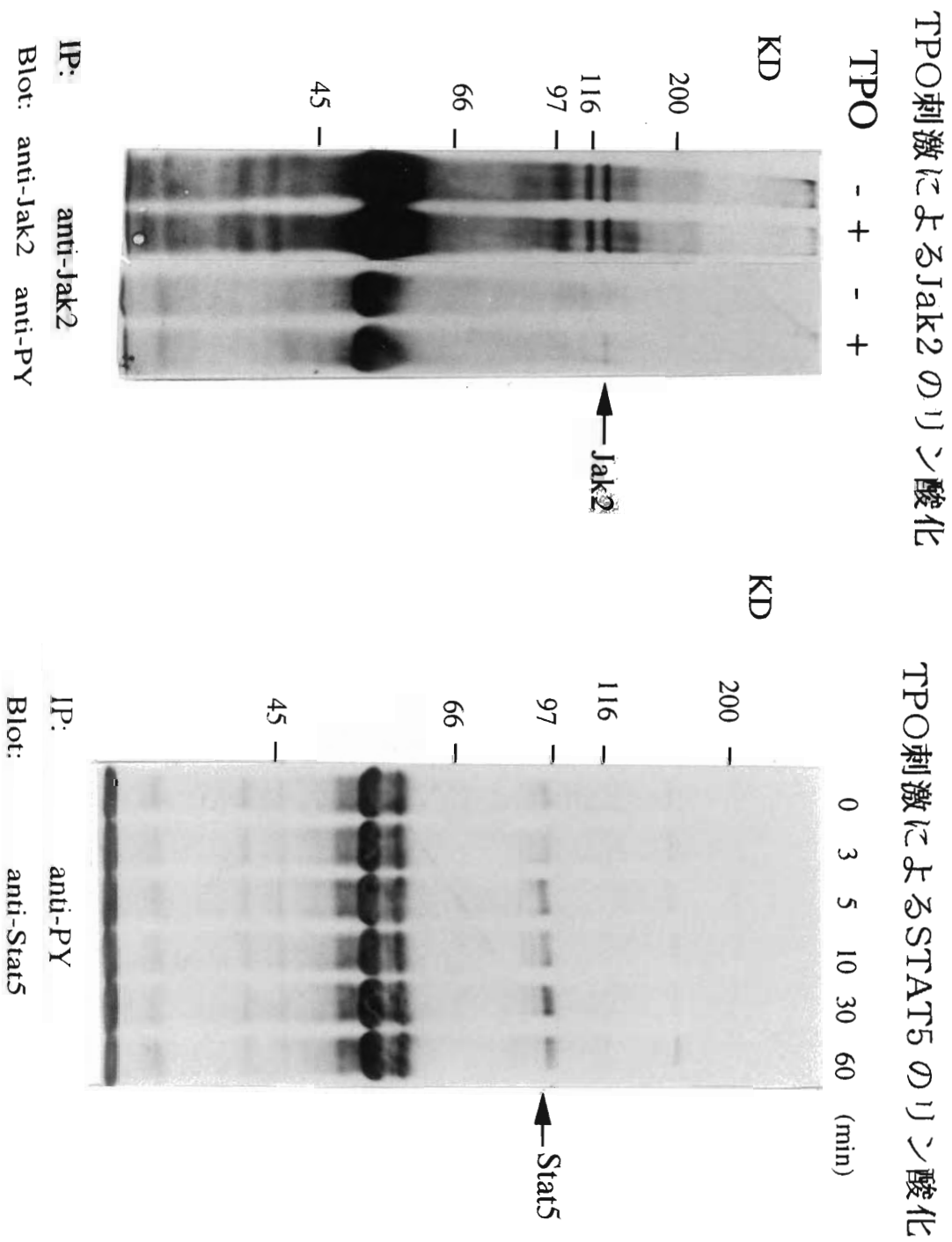


図 2.



のリン酸化が明らかとなった。95kDa、130kDaの蛋白に関してはその分子量からそれぞれSTAT, JAKである可能性が考えられた。そこで各種抗体を用いて免疫沈降を行った結果、JAK2、STAT5であることが判明した。(図2)。またtotal cell lysateでみとめられた42kDの蛋白に関しても同様にMAPK(MAP kinase)であると同定した。

### 【考察】

TPOの刺激伝達経路に、MAPKに至るRASを介する経路と、JAK-STATを介する経路の両方が存在することが明らかとなった。しかし巨核球の増殖と分化のいずれのシグナルを伝えているのかについては現在のところ不明である。現在、正常巨核球を用いた検討を行っており、シグナルと分化増殖の関係を明らかにしたいと考えている。

## (2) ヒト巨核球の多倍体化における細胞周期関連蛋白の解析

### 【方法】

1) 巨核球の形質を有する、あるいは巨核球系への分化能を有する細胞株である Meg-J、Meg01、UT-7、CMK、HEL、K562細胞にインドロカルバゾール系化合物、K-252a(0.3  $\mu$ M)を単独もしくはTPO(10ng/ml)とともに添加して液体培養し、各細胞株における ploidy の変化および巨核球の分化抗原である GPIIb/IIIa, GPIb の発現の変化についてフローサイトメトリーを用いて解析した。Meg-J細胞については形態の変化について、軟寒天培養法を用いて検討した。

2) Meg-J細胞をヒドロキシウレア(HU)存在下で15時間培養し、G1期に同調させた。その後、同調を解除してそのまま、あるいはK-252a(0.3  $\mu$ M)とTPO(10ng/ml)を添加して液体培養し、経時的に細胞をエタノール固定した。固定した細胞に抗ヒトCyclin B1抗体(マウスIgG1抗体)を添加後、二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG1抗体で処理し、さらにPI(propidium iodide)染色後、フローサイトメトリーで8Nの ploidy を有する細胞のCyclin B1の発現を測定した。

### 【結果】

Meg-J細胞にK-252aを添加して培養すると細胞は大型化し、一部偽足形成が認められた。K-252aとTPOを同時添加して培養すると、細胞はさらに大型化し、偽足形成がさらに著明となった(図3)。また、K-252a添加培養によりMeg-J細胞における血小板糖蛋白GpIIb/IIIa(CD41a)、GpIb(CD42b)の発現の増強が認められた。K-252aとTPOの同時添加はGpIIb/IIIa、GpIbの発現をさらに増強した(図4)。Meg-J細胞は4Nの細胞であるが、K-252aを添加すると多倍体化し、8-32Nの細胞が出現した。K-252aとTPOを添加すると多倍体化はさらに促進された(図5)。



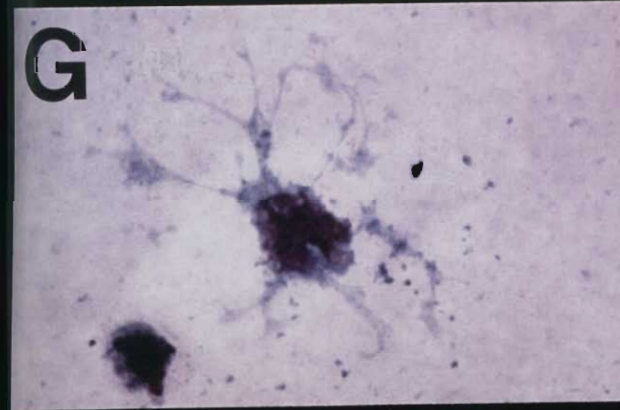
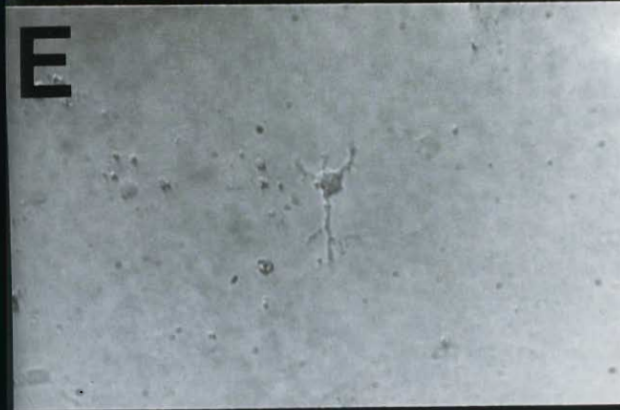
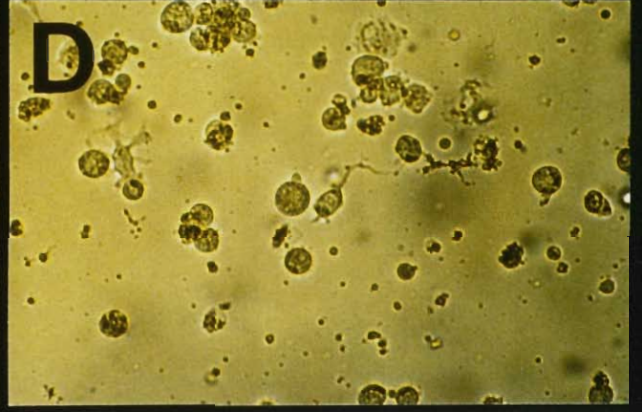
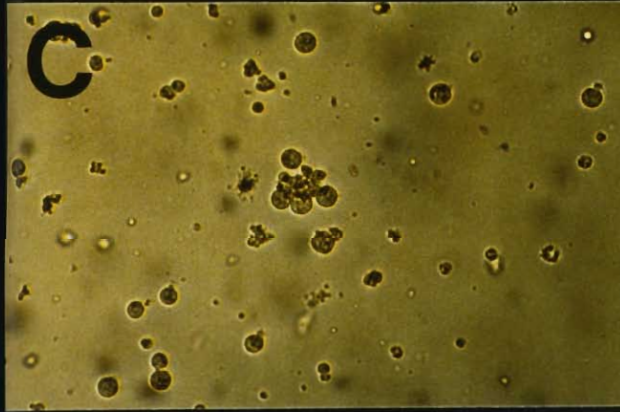
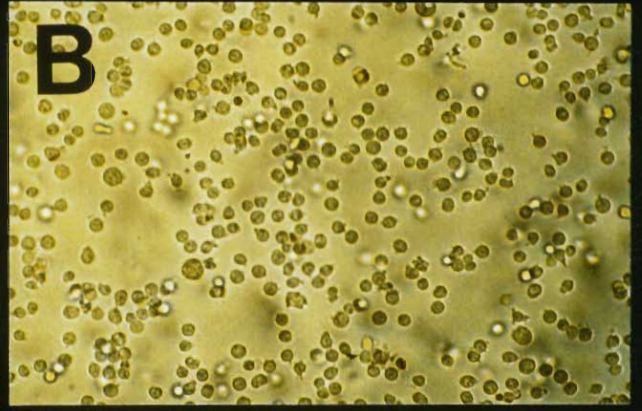
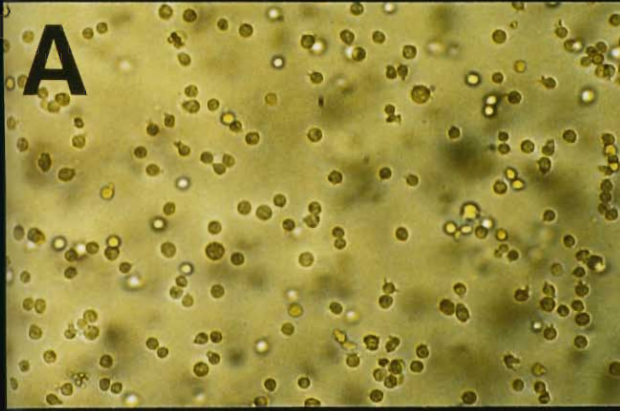
Meg01, UT-7, CMK, HEL, K562細胞はK-252aを添加して培養すると、いずれも多倍体化し巨核球の分化抗原であるGPIIb/IIIa, GPIbの発現が増強した。また、TP0で増殖が刺激される細胞株であるMeg01、UT-7、CMKはTP0を同時添加して培養することにより、K-252aによる多倍体化がさらに促進された(表1)。

Meg-J細胞はHUを添加して15時間培養すると、約90%の細胞がG<sub>1</sub>期に同調した。HUによる同調を解除した後、K-252a、TP0を同時添加して培養した細胞および無添加で培養した細胞はいずれも同調解除6時間後に同期してS-earlyG<sub>2</sub>期に移行した。この時点でこれらの細胞のCyclin B1の発現をみると、発現が増加し始めていた。同調解除12時間後にはK-252a、TP0を同時添加して培養した細胞および無添加で培養した細胞はその多くが8Nのploidyを有する細胞であり、同調解除後、K-252a、TP0を同時添加して培養した細胞はK-252aの作用によりG<sub>2</sub>期には入ったもののM期移行できない状態にあり、無添加で培養した細胞は同期してG<sub>2</sub>期からM期に入りつつある状態と考えられた。この同調解除12時間後の時点の8Nのploidyを有する細胞のCyclin B1の発現を調べてみると、無添加で培養した細胞にはCyclin B1を高発現している細胞群が認められたが、K-252a、TP0を同時添加して培養した細胞ではCyclin B1を高発現している細胞群は無添加で培養した細胞に比してごく少数にすぎなかった。同調解除24時間後にはK-252a、TP0を添加して培養した細胞のploidyの分布は同調解除12時間後の状態とほとんど同じであったが、Cyclin B1を高発現している細胞は全く認められなかった。また、同調解除48時間後には16Nのploidyを有する細胞が出現しており、これらの細胞がM期をスキップしてG<sub>2</sub>期から直接次のG<sub>1</sub>期に入ったことを示しているが、その際、Cyclin B1の高発現は認められなかった。一方、無添加で培養した細胞は、ほぼ正常なploidyの分布に戻っており、8Nのploidyを有する細胞の中には、やはりCyclin B1の高発現を示す細胞群が認められた(図6、7)。

## 【考察】

K-252aによる多倍体化および巨核球系への分化誘導はMeg-J細胞などの巨核球の形質を有する、あるいは巨核球系への分化能を有する細胞株において認められた。なお、リンパ性白血病細胞株であるMOLT-4や、骨髄球性白血病細胞株であるHL-60においてはK-252a添加による多倍体化は認められず、K-252aによる多倍体化は造血細胞では巨核球系の細胞あるいは巨核球系への分化能力のある細胞に特有な現象であると考えられた。

Meg-J細胞がM期を経て通常の細胞分裂を行う場合には、HUによる同調解除後、無添加で培養した場合に認められたように、G<sub>2</sub>/M期にCyclin B1が高発現することが必要であると考えられた。一方、多倍体化過程における細胞周期、すなわちMeg-J細胞にK-252a、TPOを同時添加して培養した場合にみられるようなM期をスキップした細胞周期を回る細胞ではCyclin B1の高発現が認められなかった。この知見はCyclin B1/CDC2キナーゼの量的な減少がこうした細胞周期を誘導している可能性があるものと考えられた。正常の巨核球が多倍体化し、分化していく過程でもM期が完了しない細胞周期を回ることが知られており、このモデル系と同じ現象がおきている可能性が考えられる。今後、正常巨核球において同様な現象が認められるかについて検討する必要がある。



(図3) K-252a、TPO添加に培養による  
Meg-J細胞の形態変化

A: 無添加 B: TPO添加 C: K-252a添加  
D: K252a+TPO添加 E: K-252a添加  
F: K252a+TPO添加 G: K252a+TPO添加  
A-D, 液体培養 E-F, 軟寒天培養  
G, 軟寒天培養後固定しH.E染色

図4

# 巨核球分化抗原GPIIb/IIIa(CD41a), GPIb(CD42b)の発現の変化

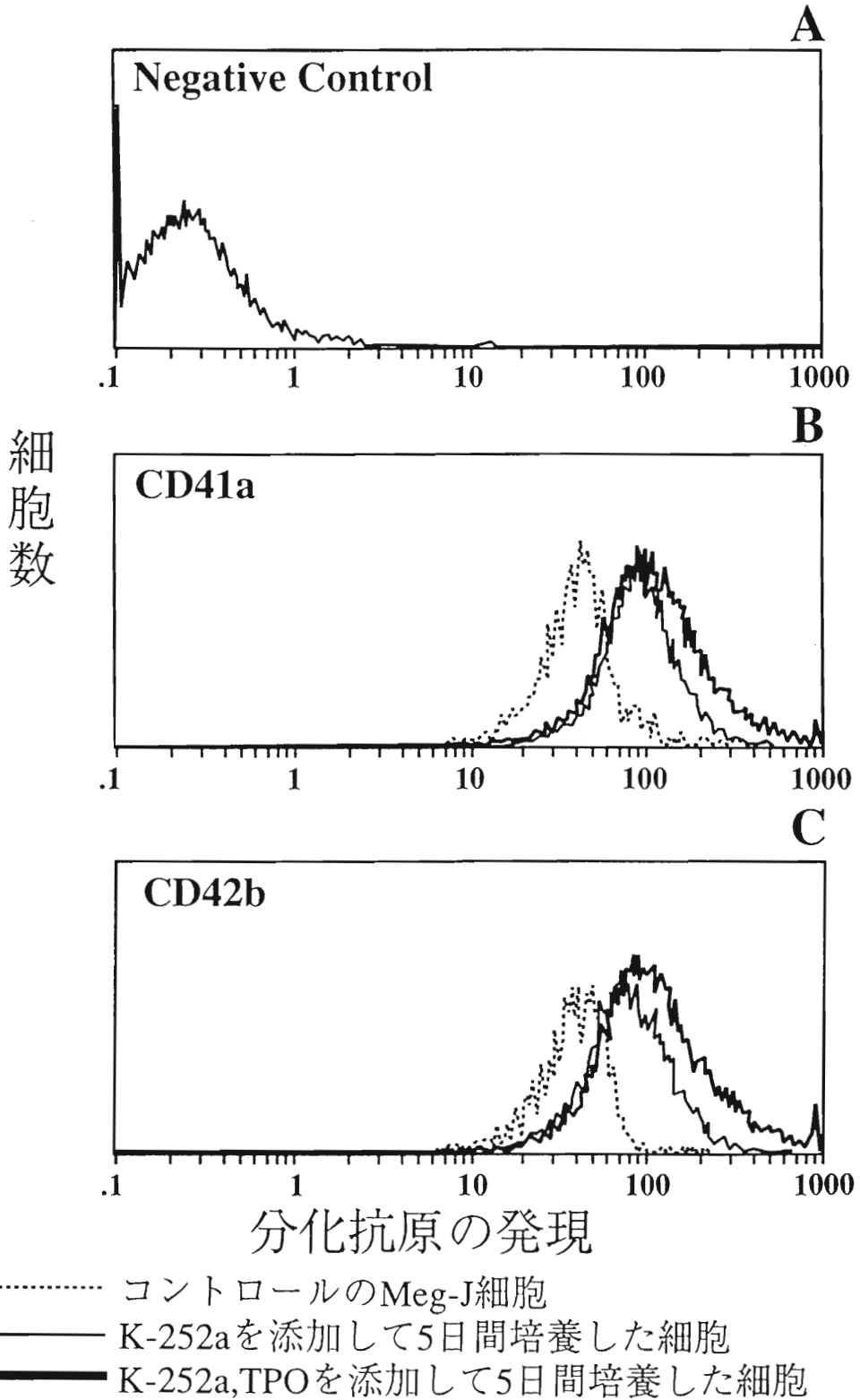
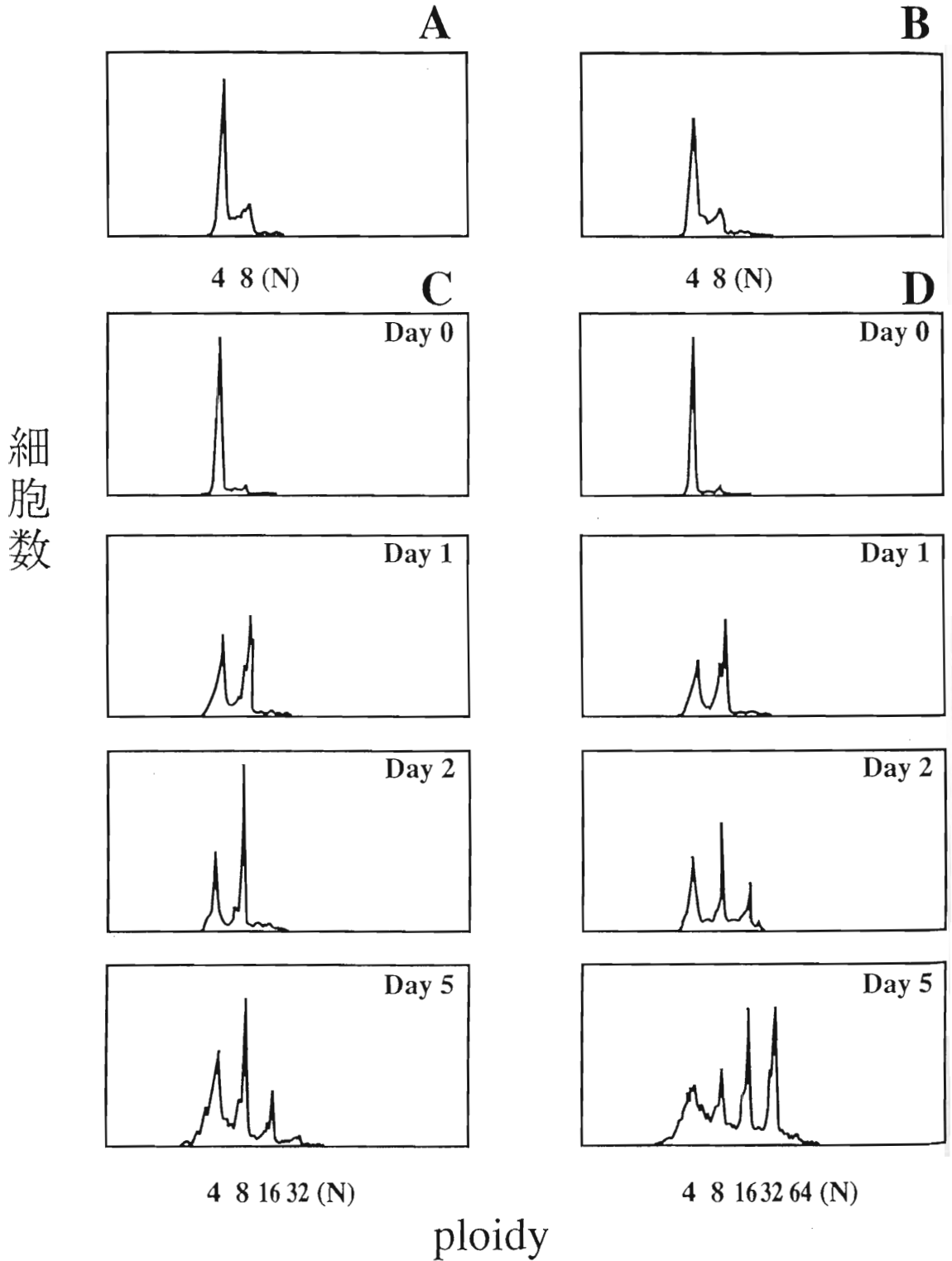
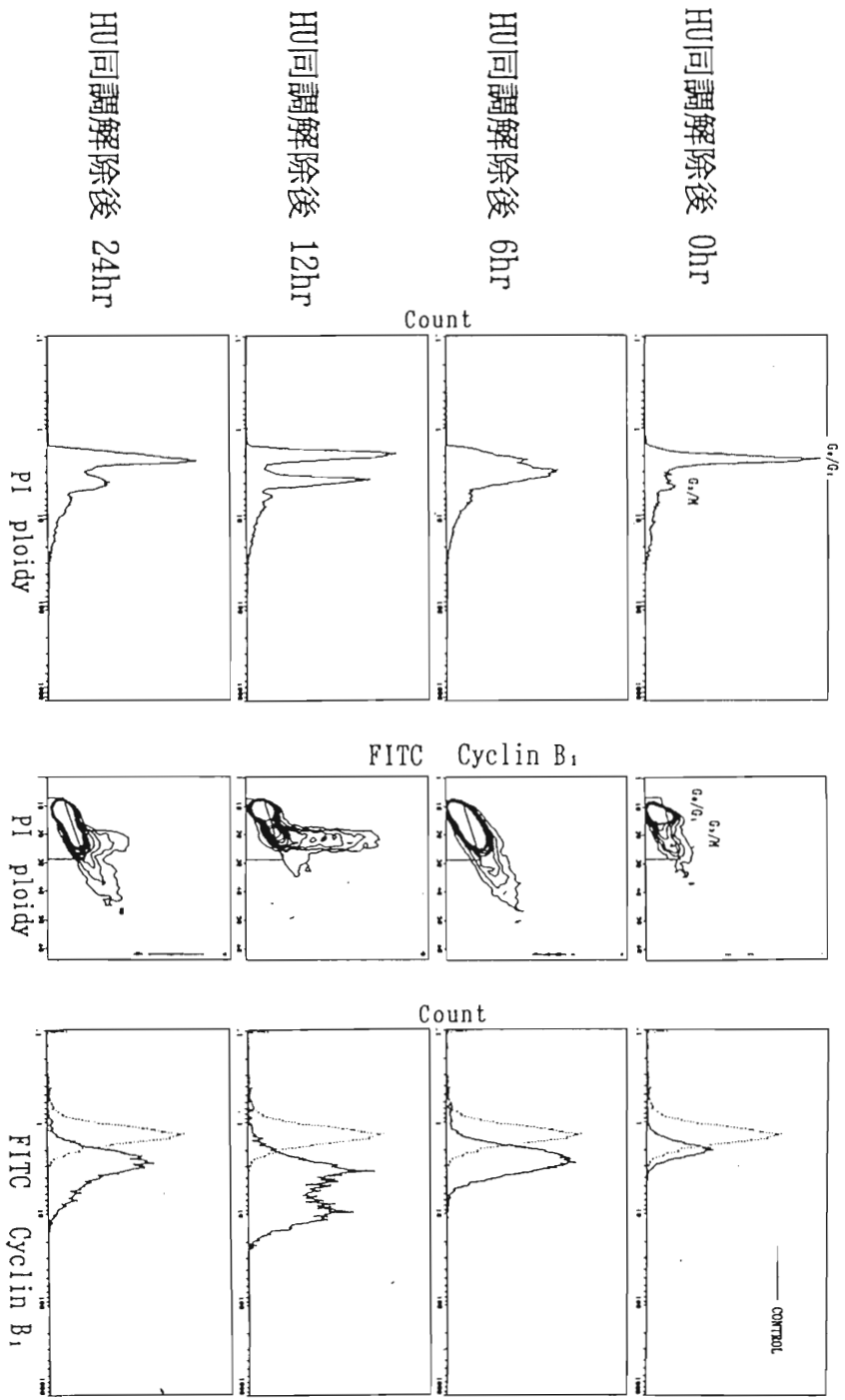


図5 K-252a単独あるいはTPOを同時添加して培養したMeg-J細胞のploidyの変化



A; コントロールのMeg-J細胞  
 B; TPOを添加して5日間培養した細胞  
 C; K-252aを添加して培養した細胞のploidyの変化  
 D; K-252a, TPO同時添加して培養した細胞のploidyの変化

ヒトロキシウラシル(HU)による同調を解除した後のCyclin B<sub>1</sub>の発現  
— K-252a, c-Mp1リカソト無添加時 —



各細胞周期における  
Cyclin B<sub>1</sub>の発現

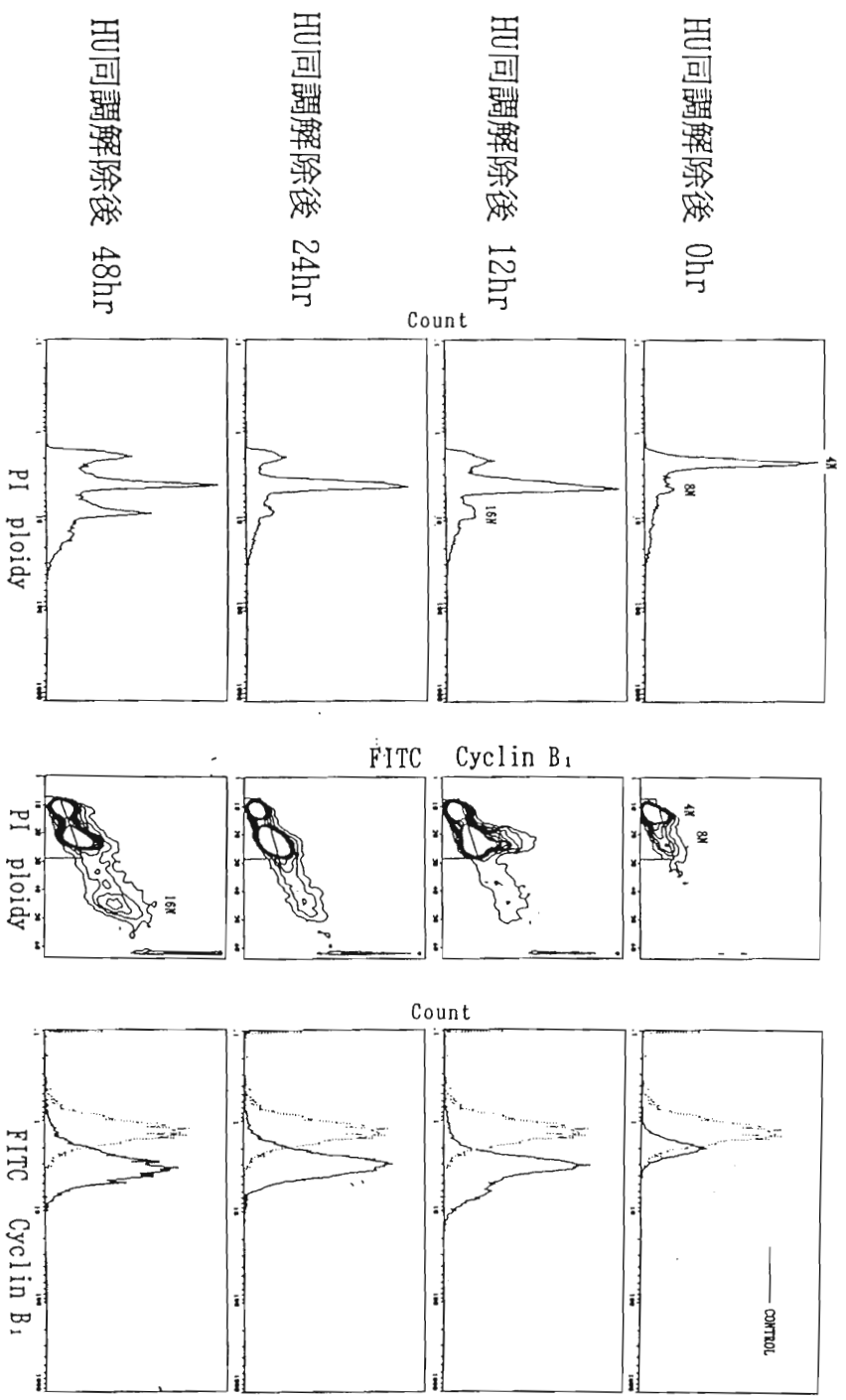
G<sub>2</sub>/M期の細胞(8Nのploidyを有する  
細胞)のCyclin B<sub>1</sub>の発現

表1

種々の巨核芽球性白血病細胞株及び巨核球の形質を有する細胞株におけるK-252aのploidyに対する影響

細胞株、及び 添加物	ploidy			
	4N	8N	16N	$\geq 32N$
CMK control	79.3	19.8	0.8	0.0
+K-252a	65.6	30.0	4.3	0.1
+K-252a+TPO	42.0	42.1	13.7	0.1
UT-7 control	60.7	33.7	3.2	0.1
+K-252a	35.2	37.0	17.1	0.1
+K-252a+TPO	28.0	38.4	24.1	0.6
Meg-01 control	72.9	26.2	0.8	0.0
+K-252a	63.0	32.5	3.9	0.3
+K-252a+TPO	36.8	41.6	15.7	0.8
K562 control	60.9	36.2	2.2	0.6
+K-252a	37.1	39.8	16.6	0.8
+K-252a+TPO	34.5	40.2	18.8	0.8
HEL control	61.5	34.2	3.0	1.3
+K-252a	16.5	39.4	43.4	2.1
+K-252a+TPO	19.2	40.8	39.3	0.3

ヒトロキシアラ(HU)による同調を解除した後のCyclin B<sub>1</sub>の発現  
— K-252a, c-Mplリカウト両者添加時 —



各細胞周期における  
Cyclin B<sub>1</sub>の発現

8Nのploidyを有する細胞  
のCyclin B<sub>1</sub>の発現



### (3) ヒト巨核球産生を制御する転写因子の検討

#### 【方法】

正常の巨核球は骨髄の中でもごく少数であり、その転写因子の解析を行なうのは極めて困難である。そこで我々は上述したMeg-J細胞による巨核球の分化モデル系を用いて検討した。K252aおよびTPOで刺激した前後のMeg-J細胞からtotal RNAを抽出し、それぞれ10mgのRNAでreverse transcriptionを行ない、cDNAを合成した。その後、巨核球系細胞に存在することが知られている転写因子であるGATA-1、GATA-2、TAL、NF-E2、またコントロールとして $\beta$ 2-microglobulinのprimerを用いて、同一条件でPCRを行った。

NF-E2の発現がMeg-J細胞のTPOおよびK-252a添加による多倍体化および分化において重要であるかどうかを検討するために、NF-E2 p45のAntisense, Sense oligonucleotidesを作成し、Meg-J細胞にTPOおよびK252aとともに添加して液体培養した。培養後、Meg-J細胞のploidyおよびGpIbの発現に対するNF-E2 p45の影響をフローサイトメトリーを用いて検討した。また、Meg-J細胞にNF-E2 p45をoverexpressionさせることにより、多倍体化や分化を誘導することができるかを検討する目的で、NF-E2 p45をElectroporationにて導入した。NF-E2 p45 expression vectorは東北大学生化学教室より供与を受けた。

#### 【結果】

TPOとk-252aで刺激したMeg-J細胞において、NF-E2 p45の発現の増強が認められた。その発現のピークは刺激1時間後に認められた(図8)。GATA-1, GATA-2, TALの発現については、TPOとk-252aで刺激した前後で変化は認められなかった(図9)。

作成したNF-E2の Antisense oligはTP0およびK252aによるMeg-J細胞のNF-E2の発現の増強を抑制した。Sense oligoでは抑制は認められなかった。この系を用いてploidy に対する影響を検討したところ、TP0およびK252a 添加による多倍体化はNF-E2のantisense添加により抑制された。Sense oligoでは抑制は認められなかった（図10）。さらにTP0および K252a 添加により認められたGPIbの発現の増強はNF-E2のantisense添加により抑制された（図11）。Sense oligoでは抑制は認められなかった。形態学的にもTP0およびK252a添加によるMeg-J細胞の大型化はNF-E2の Antisense oligo添加によりキャンセルされが、Sense oligoでは細胞の大型化の抑制は認められなかった（図12）。

オリジナルのMeg-J細胞にNF-E2 p45をtransfectしたMeg-J細胞にはNF-E2の発現の増強が認められた。しかし、transfectした細胞において多倍体化は認められず、またGpIbの発現の変化も認められなかった。

#### 【考察】

巨核芽球性白血病細胞株、Meg-JにTP0とK-252aを添加培養すると多倍体化を伴う成熟巨核球への分化がおこる。この系は巨核球造血の分子生物学的機構を解明する上で、よいモデル系であると考えられる。このモデル系を用いた検討の結果、NF-E2はploidyの増加や血小板糖蛋白の発現に重要な役割を果たしている転写因子であることが明らかになった。しかしながら、Meg-J細胞にNF-E2P45を過剰発現させても多倍体化および血小板糖蛋白の発現の増強は認められなかった。この原因としては、1つにはNF-E2 p45のcounterpartであるp18や、small Maf family蛋白などの発現が少ないため、ヘテロダイマーが形成されず、結果として転写因子としての活性が発現されなかったという可能性が考えられる。またNF-E2 以外の転写因子による負の制御が強いため、NF-E2をtransfectしても活性が示されないという可能性も考えられる。これらの点をふまえ今後さら

に検討を進めていく予定である。

(4)血小板異常を伴う種々の血液疾患に対するTPOの関与およびその治療薬としての可能性についての検討

巨核芽球性白血病においてTPOによるオートクリン増殖機構が存在するかについて検討したが、現在のところそのような機構の存在は認められていない。また、再生不良性貧血患者に対するTPOの臨床応用の可能性を検討する目的で患者骨髄細胞にTPOを添加して、巨核球コロニーが形成されるかについて検討中である。Preliminaryな結果であるが高濃度のTPO (100  $\mu$ g/ml)を添加すると少数ながら巨核球コロニーが形成される症例があるという知見を得ており、現在さらに検討中である。

図8

TPO と K252a を添加後のMeg-JにおけるNF-E2 の発現

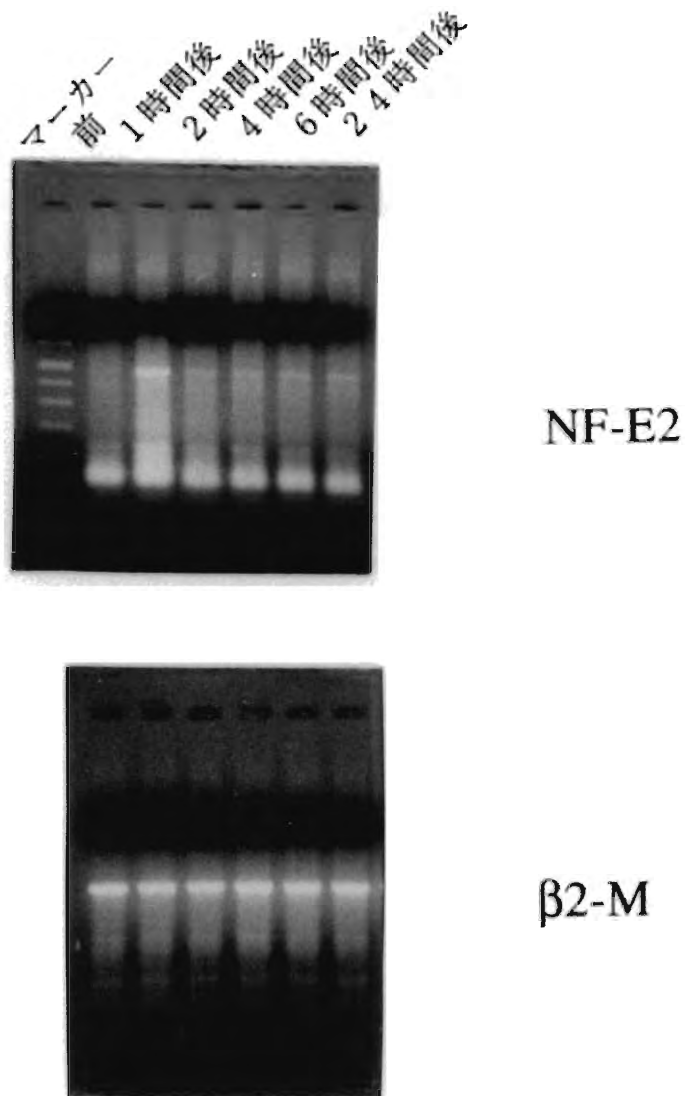


図9

TPO と K252a を添加後の

Meg-J における各種転写因子の発現

マーカー  
Meg-J  
コントロール  
TPO + K252a



GATA-1

マーカー  
Meg-J  
コントロール  
TPO + K252a



GATA-2



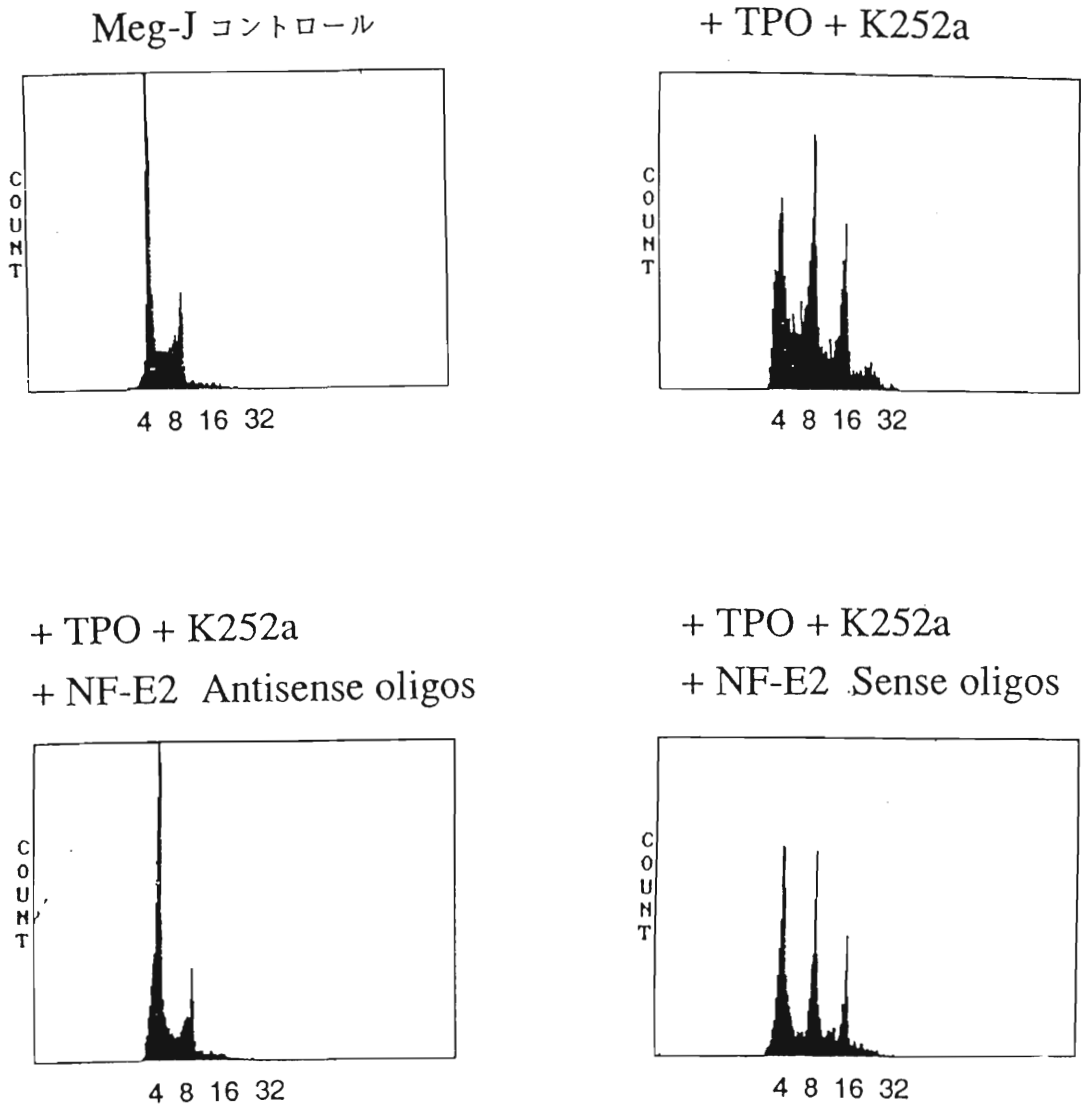
TAL



$\beta$ 2-M

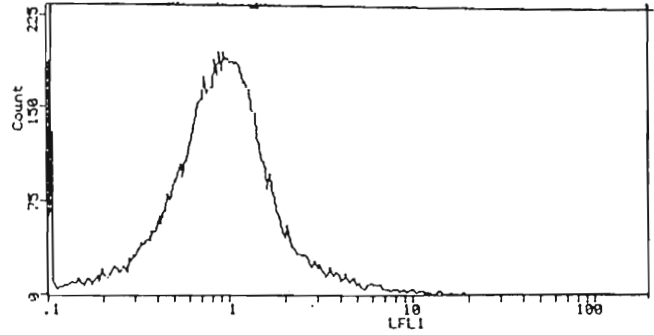
図10

NF-E2 Antisense, Sense oligonucleotidesの  
Meg-J の Ploidy に与える影響

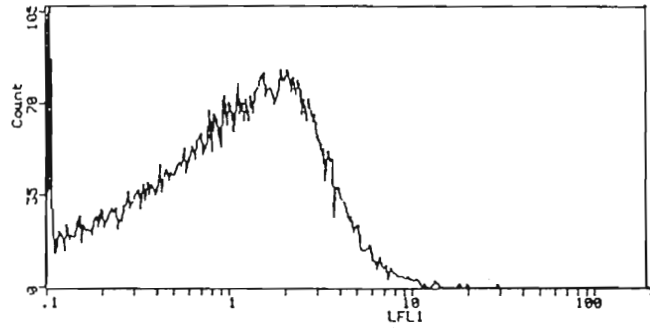


NF-E2 Antisense, Sense oligonucleotidesのMeg-Jの GPIbの発現に対する影響

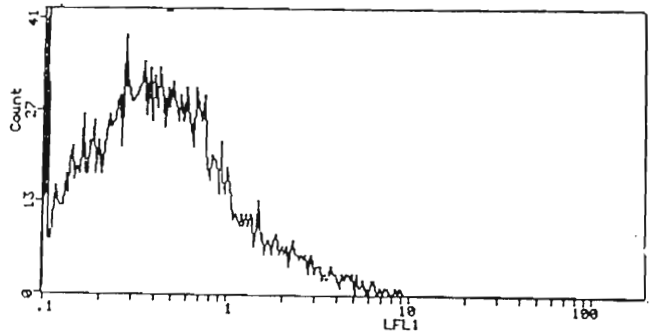
Meg-J control



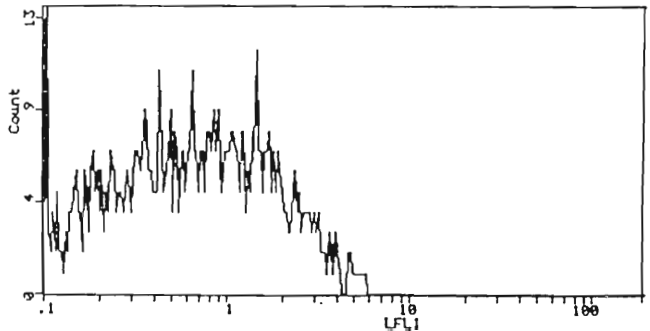
+TPO + K252a



+TPO + K252a  
+NF-E2 antisense



+TPO + K252a  
+NF-E2 sense



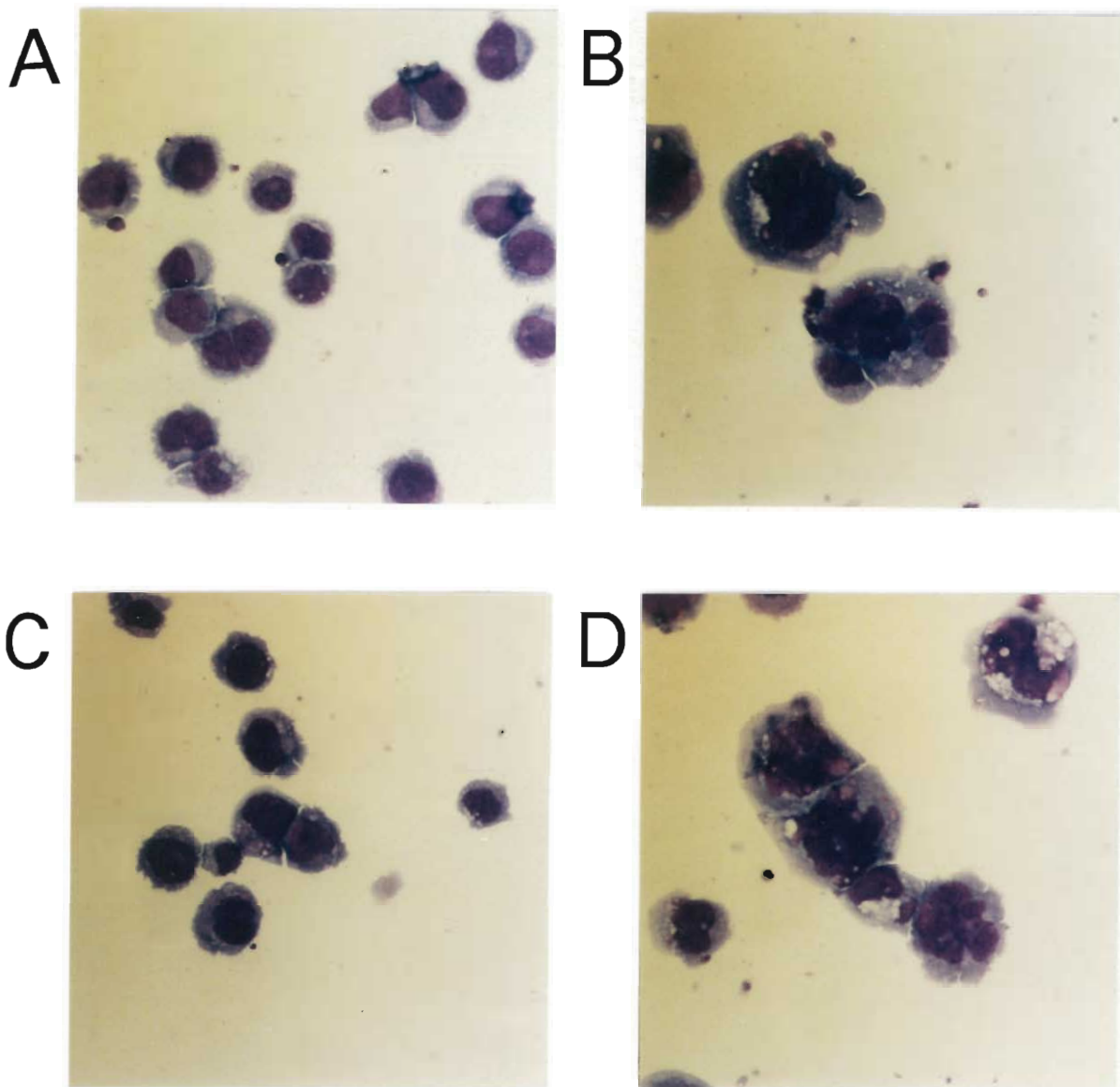


図12 TPO, K252a NF-E2 Antisense oligos  
添加時のMeg-J の形態

A Meg-J コントロール

B + TPO + K252a

C + TPO + K252a + NF-E2 Antisense oligos

D + TPO + K252a + NF-E2 Sense oligos